ChinaXiv合作期刊

第 37 卷第 12 期
2017 年 6 月
生 态 学 报
ACTA ECOLOGICA SINICA
Vol.37,No.12
Jun.,2017

DOI: 10.5846/stxb201605200974

高春蕾,孙萍,贾智慧,姜美洁,赵翠琼,张学雷,吴振兴,梁成珠.温度和营养盐限制对网状原角藻生长与产毒的影响.生态学报,2017,37(12):4217-4226.

Gao C L, Sun P, Jia Z H, Jiang M J, Zhao C Q, Zhang X L, Wu Z X, Liang C Z. Effects of temperature and nutrient limitation on growth and yessotoxin production of *Protoceratium reticulatum*. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(12): 4217-4226.

温度和营养盐限制对网状原角藻生长与产毒的影响

高春蕾[1,2,3,*],孙 萍[1,2,3,4],贾智慧[1],姜美洁[1,2,3],赵翠琼[5],张学雷[1,2,3],吴振兴[6],梁成珠[6]

1 国家海洋局第一海洋研究所,青岛 266061
2 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室,青岛 266061
3 国家海洋局海洋环境与科学重点实验室,青岛 266061
4 中国海洋大学,青岛 266003
5 国家海洋局东海预报中心,上海 200081
6 山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心,青岛 266002

摘要:网状原角藻(*Protoceratium reticulatum*)是能够形成有毒赤潮的海洋甲藻之一,所产毒素为虾夷扇贝毒素(yessotoxins, YTXs),该藻在全球很多海域中普遍存在,其生长与产毒特征表现出较强的海域差异性。以分离自我国北黄海海域的网状原角藻为实验对象,研究了温度和营养盐(N、P)限制对该藻生长与产毒的影响。研究发现:温度和营养盐限制对藻细胞的生长和产毒均有影响,但营养盐限制影响更为显著。较低的温度更适宜 *P. reticulatum* 的生长,15℃时无营养盐限制的 L_1-Si 培养基中藻细胞生长最好。营养盐限制尤其是 P 限制能够显著降低藻细胞的比生长速率和细胞密度($P<0.01$),缩短藻细胞指数生长期和稳定期的持续时间。所有温度下 N、P 限制均有利于藻细胞内毒素累积,15℃ P 限制培养基中单个藻细胞中 YTX 毒素最高,达到 92.6 pg/细胞,分别是相同培养温度下 N 限制和 L_1-Si 中藻细胞毒素含量的 3.8 倍和 7.1 倍。温度变化对 N 和 P 限制下藻细胞毒素含量影响不同:在 5—15℃ 范围内,随温度升高,N 限制培养基中藻细胞 YTX 含量增幅逐渐下降,而 P 限制条件下反之。在所有培养条件下,滤液中毒素含量在稳定期后开始增多,与 L_1-Si 相比,N、P 限制不利于毒素的释放。高温能促进 L_1-Si 培养基和 N 限制培养基中毒素的释放,但对 P 限制影响不显著。

关键词:网状原角藻;营养盐限制;温度;虾夷扇贝毒素;北黄海

Effects of temperature and nutrient limitation on growth and yessotoxin production of *Protoceratium reticulatum*

GAO Chunlei[1,2,3,*], SUN Ping[1,2,3,4], JIA Zhihui[1], JIANG Meijie[1,2,3], ZHAO Cuiqiong[5], ZHANG Xuelei[1,2,3], WU Zhenxing[6], LIANG Chengzhu[6]

1 *First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao* 266061, *China*
2 *Laboratory of Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao; National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao* 266061, *China*
3 *Key Laboratory of Marine Ecological Environmental Science and Engineering, State Oceanic Administration, Qingdao* 266061, *China*
4 *Ocean University of China, Qingdao* 266003, *China*
5 *East China Sea Forecast Center, State Oceanic Administration, Shanghai* 200081, *China*
6 *Inspection and Quarantine technology Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao* 266002, *China*

基金项目:国家自然科学基金(41206161);海洋公益性行业科研专项经费项目(201305010);国家海洋局第一海洋研究所基本科研业务专项资金项目(2012T08, GY2013G28);国家基金委-山东省联合基金项目"海洋生态与环境科学"(U1406403);青岛市创业创新领军人才项目计划(13-CX-28)

收稿日期:2016-05-20; **修订日期**:2017-01-16

*通讯作者 Corresponding author.E-mail: gaochunlei@fio.org.cn

chinaXiv:201706.00850v1
http://www.ecologica.cn

ChinaXiv合作期刊

Abstract: *Protoceratium reticulatum*, a marine dinoflagellate that produces yessotoxins (YTXs), is common in coastal waters worldwide and can form toxic algal blooms. There are marked differences in its growth and toxin-producing characteristics in different areas. This study investigated the effects of temperature and nutrient (N, P) limitation on the growth and toxin production of *P. reticulatum* recently isolated from the North Yellow Sea. The results showed that temperature and nutrient limitation affected growth and toxin production of the alga to different degrees, but nutrient limitation had a more significant influence. Lower temperatures were more suitable for the growth of *P. reticulatum*. Growth of algal cells in L_1-Si medium without nutrient limitation was best at 15℃. P limitation greatly reduced the specific growth rate and cell density ($P < 0.01$), and shortened the duration of the exponential and stationary phases. N-limited cultures, in contrast, resulted in a growth rate and maximum cell density similar to those in L_1-Si medium, but with a shorter stationary phase. At all temperatures, both N and P limitation were favorable for the accumulation of YTX in algal cells, which was particularly marked in the latter. The maximum YTX content of 92.6pg/cell was observed in 1/10P medium at 15℃ at the end of the stationary phase. This was approximately 3.8 times and 7.1 times that of the YTX in the N limited and L_1-Si medium at the same culture temperature, respectively. Changes in temperature had different influences on the content of intracellular YTX in N- and P-limitation cultures. In the range of 5—15℃, temperature change had a negative effect on YTX increase under N limitation, whereas in P-limited medium, the effect was positive. In all culture conditions, the YTX concentration in the filtrate began to increase during the stationary phase. Compared with L_1-Si, both N- and P-limited media were not conducive to the release of toxins. Higher temperature helpful to YTX release in the L_1-Si and N-limited media, but it did not significantly affect that in the P-limited medium.

Key Words: *Protoceratium reticulatum*; nutrient limitation; temperature; yessotoxin (YTX); North Yellow Sea

近年来,有毒有害赤潮在全球很多海域中频繁发生,对当地的水产养殖、旅游、人类健康和生命安全等造成了极大的危害。有毒赤潮的危害不仅取决于赤潮藻的生物量,还受到藻细胞毒素含量的影响。对于能够形成有毒赤潮的甲藻,其生长和产毒会受到许多因素的影响,其中营养物质、温度、盐度、光照等都是非常重要的影响因子。但环境因素对藻细胞生长与产毒的影响因藻种而异,相同环境条件下,不同的藻结果可能完全不同。

网状原角藻(*Protoceratium reticulatum*)是广泛分布于全球近岸海水中并能够形成赤潮的有毒甲藻之一,是第一个被确认产生虾夷扇贝毒素(yessotoxins, YTXs)的单细胞藻类[1],已在新西兰[2-4]、日本[5-6]、挪威[7-8]、意大利[9]、英国和加拿大[10]、西班牙和美国[11-12]、德国[13]等国的近岸海水中分离到。该藻所产的虾夷扇贝毒素是一类毒性较强的细胞毒素[14-15],心脏、肝脏、神经系统、免疫系统、细胞溶酶体、胸腺等都有可能是 YTXs 作用的靶器官[16]。贝类通过滤食藻细胞将 YTXs 在体内累积转化并沿食物链传递,对贝类消费者及人类健康及生命安全造成了潜在的威胁。

目前对该藻的研究大多集中于其所产毒素的种类、结构及毒素的检测方法等,对于环境因子对网状原角藻生长和产毒的影响的研究并不是太多。2001 年,Seamer[17]最早开展了温度、光照、盐度、营养盐单因素变化对新西兰海域的网状原角藻生长及产毒的影响研究;2004 年,Mitrovic[18]等报道了微量元素 Fe、Se 和 Co 对相同海域中网状原角藻生长和产毒的影响;之后,Paz 等[19]和 Rodríguez 等[20]分别报道了温度、光照和盐度及成倍提高 L_1-Si 中大量营养盐(N、P)的浓度对西班牙海域的网状原角藻生长与产毒的影响;Guerrini[21]等以分离自意大利亚得里亚海的网状原角藻为研究对象,研究了盐度、温度及营养盐对该藻产毒的影响; Röder 等[13]报道了盐度、温度及营养盐对北海德国湾的网状原角藻生长与产毒的影响。通过分析已有的研究发现,环境因子会强烈影响藻细胞密度和藻毒素的种类与组成,但是由于采用了不同地理株系开展研究,很多情况下即使环境因子相同得到的结果却不同甚至相互矛盾。可见,藻株生长、YTXs 合成及毒素组分的变异性与藻株的地理分布密切相关[5,8-9]。

我国也是有毒赤潮高发的国家之一,贝类中赤潮毒素沾染情况亦较严重,而 YTXs 毒素是近年来贝类中累积含量较高的毒素之一,如陈建华等从 2011 年采自北黄海海域的虾夷扇贝样品中检测到的 YTX 毒素含量

chinaXiv:201706.00850v1

ChinaXiv合作期刊

竟高达 $6.68\times10^3 \mu g/kg$ [22],大大超出了欧盟规定的安全食用标准(3750 μg/kg),严重威胁消费者的食用安全。2014 年国家海洋环境监测中心梁玉波研究团队成功从北黄海海域分离纯化到 1 株网状原角藻,这也是目前国内首次分离到产 YTXs 的网状原角藻,为进一步研究该藻生长、产毒、赤潮发生发展及防控、毒素危害及致毒机理等提供了最基本的研究材料。

由于是首次在我国海域中分离到网状原角藻,关于该株藻生长和产毒的相关信息尚为空白,加之近海贝类中 YTXs 污染情况严重,进行相应的研究就显得非常迫切和必要。本研究以北黄海域的网状原角藻为研究对象,选择对藻细胞生长和产毒影响比较显著的两个环境因子——温度和营养盐,研究不同温度和 N、P 营养盐限制条件下该藻的生长与产毒情况的变化,为更深入地了解该藻存在、大量繁殖与现场环境因子之间的联系,补充该藻的生理生态学相关信息,预防该藻赤潮爆发及海洋食品安全提供数据参考。

1　材料与方法

1.1　藻种培养

实验用网状原角藻采自北黄海海域,经分离纯化而得。

藻种培养所用海水取自青岛石老人海水浴场,盐度为 31, pH 为 7.9±0.1,砂滤后经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,转移至三角瓶中高温高压(120℃, 0.12 MPA)灭菌冷却至室温,按比例加入除菌的无 Si L_1 培养基(L_1-Si)(Guillard 和 Hargraves, 1993)[23],于 15℃,光照强度为 90 μmol m^{-2} s^{-1}的恒温恒湿的气候室中培养,光暗比为 12h∶12h。

1.2　实验方法

1.2.1　实验设计

实验中共设 4 个温度梯度,分别为 5、10、15、20℃;在每个温度下再设 3 种培养基,分别为 L_1-Si 培养基、N 限制 L_1-Si 培养基(N 浓度为 L_1-Si 中的 1/10,以下简称为 1/10N)、P 限制 L_1-Si 培养基(P 浓度为 L_1-Si 中的 1/10,以下简称为 1/10P),共 12 种组合,每种组合设 3 个平行样,试验周期为 48 d。

在实验正式开始前,将网状原角藻在相应的温度条件下驯化一个培养周期。

实验采用一次性培养的方法。将近岸海水经过孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜过滤并高温灭菌后,按照不同的 N、P 浓度添加 L_1 培养基各种营养盐储备液(经 0.2 μm 一次性无菌针头滤器(ø25 mm, Pall, USA)过滤除菌),配制成实验需要的 3 种培养基,并将配制好的培养基置于实验需要的不同培养温度下进行同步化。取经驯化后的平台期藻细胞进行接种,初始接种密度均为 500 个细胞/mL,培养体积均为 1000 mL,置于 GZX-250BS-Ⅱ型光照培养箱(上海新苗医疗器械厂)内培养,光强为 90 μmol m^{-2} s^{-1},光暗周期为 12h∶12h。接种当天取样,之后每 3 d 取 1 次样,时间为 18∶00 点,试验中所测参数之所需样品的采集均同步进行。

1.2.2　样品采集、处理及分析

(1)藻细胞计数、形态观察及比生长速率计算

自接种日起每 3d 取 1 次样,取样前轻轻晃动培养瓶,使藻液充分混匀。取 2 mL 藻液,加入 1% Lugol′s 碘液固定,混匀后,用浮游植物计数板在 TE2000 倒置显微镜(Nikon, Japan)下计数,同时观察细胞形态的变化。

藻的比生长速率按以下公式计算:比生长速率(μ)=($\ln N_1 - \ln N_0$)/($t_1 - t_0$), 式中 μ 为比生长速率(d^{-1}), N_0和 N_1分别为 t_0和 t_1时间的细胞密度。

(2) 毒素提取与分析

藻毒素提取　取 20 mL 藻液,低真空度抽滤至 GF/F 膜(ø25 mm, Whatman™, UK),同时收集滤液用于胞外毒素分析。将带有藻细胞的滤膜剪碎后,用 4mL 80%的甲醇冰浴中超声破碎,反复镜检,直至细胞全部破碎。4℃,6500 r/min 离心 10 min,收集上清;重复提取 1 次,合并两次的上清液,80%甲醇定容至 10 mL。用 0.22 μm的尼龙膜(ø13 mm,艾杰尔,北京)过滤,滤液置于-20℃保存至分析。

胞外毒素提取　根据 Paz 等[12]的方法并稍作调整收集滤液中的毒素。具体洗脱步骤为:依次用 10 mL

chinaXiv:201706.00850v1
http://www.ecologica.cn

ChinaXiv合作期刊

70%甲醇和 10 mL 20%的甲醇平衡固相萃取(SPE)小柱后,将 20 mL 滤液上样到 SPE 小柱;用 10 mL 20%的甲醇洗脱 SPE 小柱,弃掉洗脱液;之后,用 10 mL 70%的甲醇洗脱 SPE 小柱,收集洗脱液,用 0.22 μm 的尼龙膜过滤,滤液置于-20℃保存至分析。

毒素的分析检测 采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法进行藻毒素和胞外毒素的检测。液相色谱-质谱系统为 Agilent1200 液相系统(包括 G1311A 四元泵、G1313A 自动进样器,G1316A 柱温箱);API4000 三重四极杆质谱检测器(Applied Biosystems GmbH, Germany),离子源为 ESI 电喷雾离子源;液相色谱柱为 Phenomenex RP C18 柱(150×3.0mm, 5μm)。

液相色谱条件 流动相 A 为水(含 0.1%甲酸,5 mmol/L 甲酸铵),流动相 B 为 95%乙腈水溶液(含 0.1%甲酸,5 mmol/L 甲酸铵);流速为 0.3 mL/min,进样体积 10 μL,柱温 30℃,梯度洗脱程序如表 1 所示。质谱检测条件 采用 ESI+/-切换多参数扫描方式(MRM),各项参数见表 2 和表 3 。

表 1 液相梯度洗脱程序

Table 1 Liquid chromatography process of gradient elution

时间/min Time	流速/(mL/min) Flow rate	A/%	B/%	时间/min Time	流速/(mL/min) Flow rate	A/%	B/%
0	0.3	70	30	9.1	0.3	70	30
2	0.3	10	90	15	0.3	70	30
9	0.3	10	90				

A: 水(含 0.1%甲酸,5 mmol/L 甲酸铵);B: 95%乙腈水溶液(含 0.1%甲酸,5 mmol/L 甲酸铵)

表 2 多反应监测参数(正离子模式)

Table 2 Parameters of multiple reaction monitoring (Positive ion mode)

Q1 Mass/(Da)	Q3 Mass/(Da)	时间 Time(msec)	毒素 Toxins	DP /(volts)	EP/ (volts)	CE/ (volts)	CXP/(volts)
508.4	490.4	100	GYM	100	10	34	10
692.3	674.6	100	SPX1	100	10	44	10
876.3	823.3	100	PTX2	100	10	36	10
842.5	824.5	100	AZA1	100	10	30	10

Q1 Mass: 四级杆质谱 1 Quadrupole mass 1; Q3 Mass: 四级杆质谱 3 Quadrupole mass 3; DP: 去簇电压 Declustering potential;EP:射入电压 Entrance potential; CE: 碰撞电压 Collision energy;CXP:碰撞室出口电压 Cell exit potential

表 3 多反应监测参数(负离子模式)

Table 3 Parameters of multiple reaction monitoring (Negative ion mode)

Q1 Mass/ (Da)	Q3 Mass/ (Da)	时间 Time(msec)	毒素 Toxins	DP /(volts)	EP/ (volts)	CE/ (volts)	CXP/(volts)
803.6	255.1	200	OA	-100	-10	-65	-15
1141.6	1061.6	100	YTX	-100	-10	-36	-15
1155.5	1075.5	100	hYTX	-100	-10	-36	-15
1157.5	1077.5	100	45-OH-YTX	-100	-10	-36	-15
803.8	255.2	100	DTX2	-150	-10	-65	-15
817.9	255.2	100	DTX1	-126	-10	-65	-15

1.2.3 数据处理与分析

采用 SPSS 13 统计软件分别进行方差的单变量分析和多重比较分析,分析不同温度和 N、P 限制对网状原角藻生长及产毒是否具有显著影响。设定 $\alpha=0.05$,数据以 M±S.D.表示($n=3$)。当 $P<0.05$ 时具有显著性差异,$P<0.01$ 时具有极显著差异。另外,利用 Origin 9.0 作图软件进行作图分析。

2 实验结果

2.1 温度和 N、P 限制对网状原角藻生长的影响

根据图 1 和图 2,温度和营养盐限制均对藻细胞的生长有影响,但影响的程度与细胞生长阶段不同。

chinaXiv:201706.00850v1

ChinaXiv合作期刊

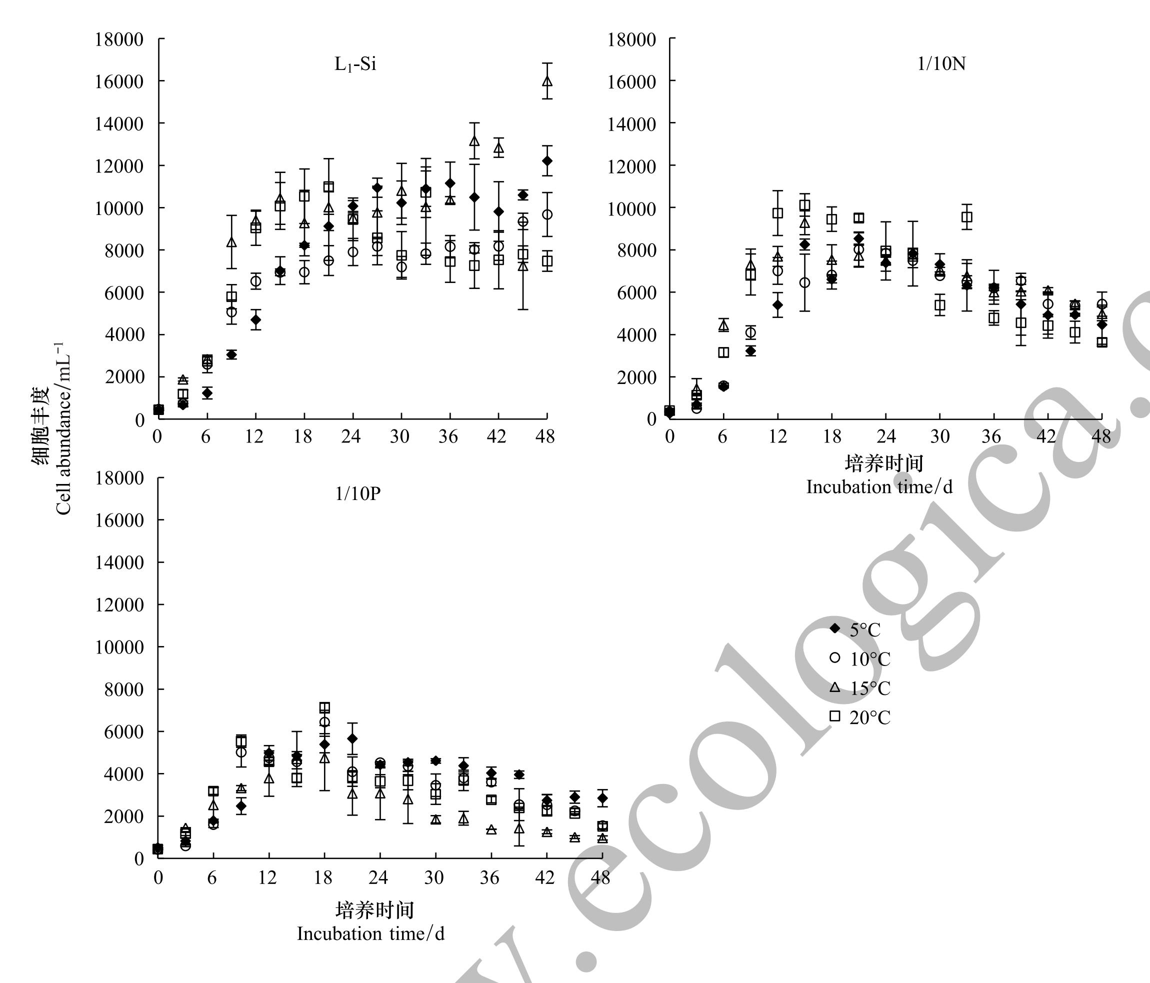


图 1　不同温度和营养盐条件下网状原角藻的生长情况

Fig.1　Growth curves of *P. reticulatum* cultured at different temperature and nutrient levels

在所有温度条件下,网状原角藻均在 L_1-Si 培养基中生长最好,最大细胞密度和比生长速率也出现在该培养基中, P 限制则显著抑制藻的生长。以 15℃为例,P 限制培养基中最大细胞密度和比生长速率分别为 0.47 $\times10^7$个细胞/L 和 0.132 d^{-1},仅为 L_1-Si 的一半,差异极显著(P<0.01);另外,P 限制明显缩短了藻细胞的指数生长期和稳定期,与 L_1-Si 培养基相比至少提前 6d 结束指数生长期;N 限制明显缩短了稳定期的持续时间,对指数生长期藻细胞的生长影响不大。

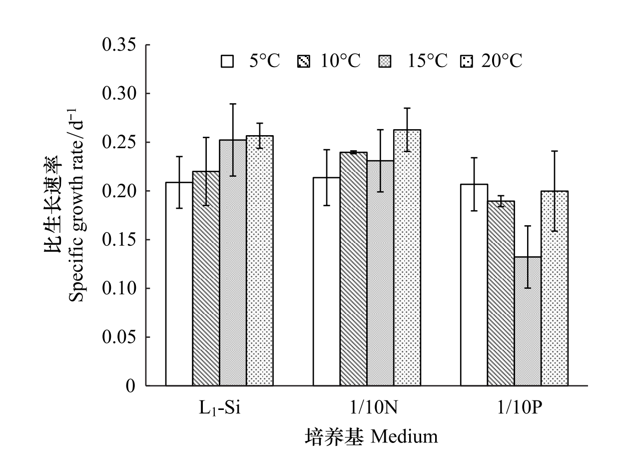


图 2　不同温度和营养盐条件下网状原角藻比生长速率的变化

Fig.2　Changes of specific growth rate of *P. reticulatum* in the exponential phase at different temperature and nutrient levels

温度的影响主要体现在 L_1-Si 和 N 限制培养基中藻细胞指数生长期阶段,在此阶段藻细胞的生长基本与温度变化呈正相关,高温区(15℃和 20℃)和低温区(5℃和 10℃)之间细胞密度差异显著(P<0.05)。但在 P 限制培养基中,5—15℃范围内藻细胞的生长与温度变化呈负相关。指数生长期后,温度的影响在营养盐限制的培养基中变得不明显,藻细胞密度均开始下降并快速进入衰败期;20℃ L_1-Si 培养基中藻细胞也表现出相似的生长情况,但其余温度下藻细胞在经过较长的稳定期后密度又出现“返增”现象。

chinaXiv:201706.00850v1

http://www.ecologica.cn

ChinaXiv合作期刊

2.2 温度和 N、P 限制对网状原角藻产毒的影响

2.2.1 温度和 N、P 限制对网状原角藻胞内 YTX 含量的影响

HPLC-MS/MS 检测发现,网状原角藻主要产 YTX 及少量 YTX 衍生物,其中 YTX 占到 96%,所以本实验中主要以 YTX 含量的变化来考察温度和 N、P 限制对其产毒的影响。

研究发现,在所有培养条件下,网状原角藻胞内 YTX 含量随着藻细胞的生长阶段有着相同的变化的趋势:指数生长期藻细胞内 YTX 含量较稳定,从指数生长期后期开始,胞内 YTX 浓度开始急剧增加,稳定期末期时达到最高,之后开始下降。

与无营养盐限制相比,N、P 限制能显著提高网状原角藻胞内 YTX 的含量。1/10N 培养基中,从指数生长期后期或稳定期前期,各温度下胞内 YTX 含量开始明显升高,但增幅与温度变化呈负相关:5℃时 YTX 含量最高,约为 30 pg/细胞,15℃和 20℃时毒素含量降低到 20 pg/细胞左右;1/10P 培养基中,从指数生长期的中期开始,胞内 YTX 含量就开始升高,略早于 L_1-Si 和 1/10N 培养基。在 5—15℃范围内,胞内 YTX 毒素含量随温度升高而升高,20℃时,毒素含量开始下降,其中 15℃时稳定期末期单个藻细胞中 YTX 毒素含量最高,达到 92.6 pg/细胞,显著高于其余 3 个温度(P<0.01)(图 3)。

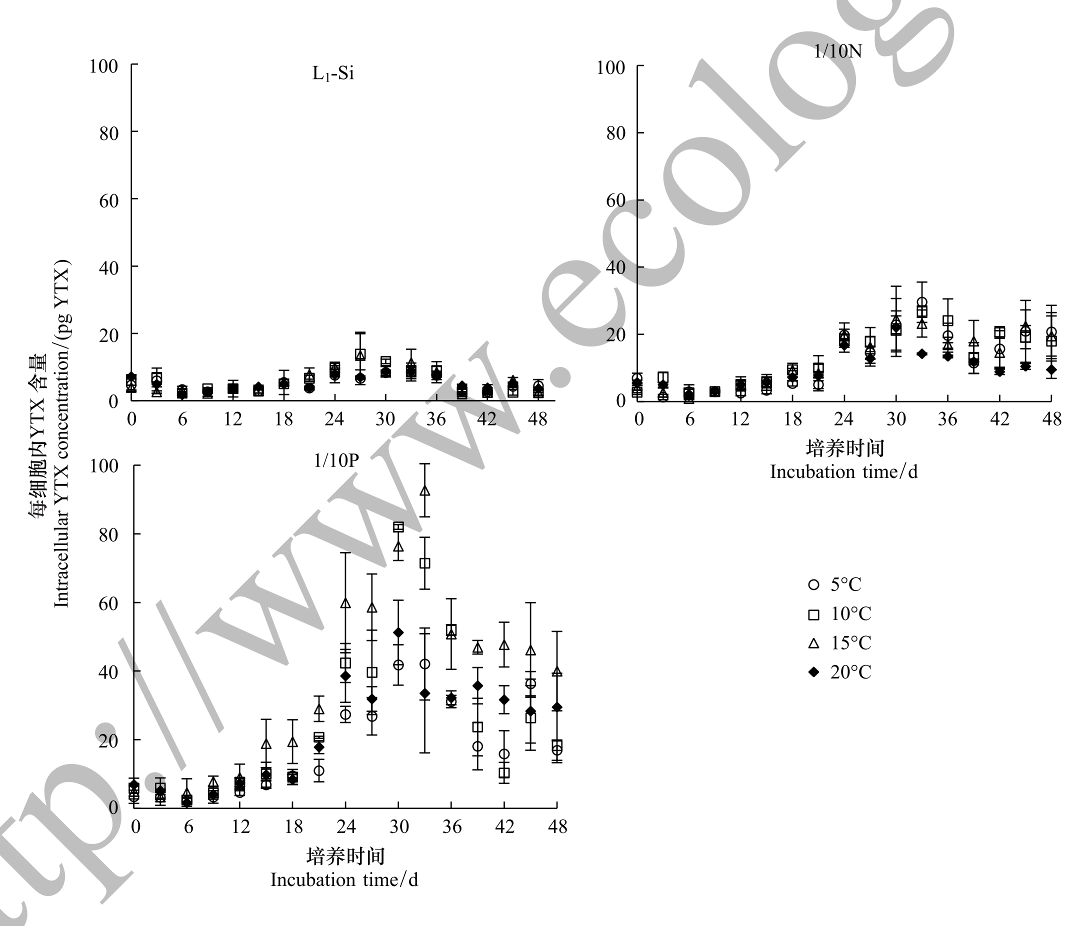


图 3 不同温度和营养盐条件下网状原角藻胞内 YTX 浓度变化情况

Fig.3 Changes of intracellular YTX concentration of *P. reticulatum* at different temperature and nutrient levels

2.2.2 温度和 N、P 限制对网状原角藻胞外 YTX 含量的影响

滤液中的 YTX 毒素主要来源于藻细胞正常代谢分泌和死亡细胞的释放而来。指数生长期和稳定期细胞死亡较少,滤液中的毒素主要来源于藻细胞的代谢分泌,而稳定期以后细胞逐渐衰败死亡,胞内大量毒素释放。为了客观地评价温度和营养盐限制对网状原角藻胞外 YTX 毒素含量的影响,本研究只比较指数生长期和稳定期滤液中毒素含量的变化。为了便于胞内和胞外毒素进行比较,根据测定的滤液中毒素的浓度及相应

chinaXiv:201706.00850v1
http://www.ecologica.cn

ChinaXiv合作期刊

的细胞密度,将滤液中 YTX 毒素折算成单细胞浓度,从而比较胞内和胞外毒素的细胞配额的变化。

从图 4 可以看出,在所有培养条件下及各个不同的生长阶段,滤液中 YTX 毒素的浓度均很低。不论是指数生长期还是稳定期,L_1-Si 培养基滤液中 YTX 毒素含量显著高于 N 和 P 限制下滤液中 YTX 毒素含量($P<0.01$),且随温度升高明显升高;N 和 P 限制均不利于 YTX 的释放,高温能加剧 N 限制下 YTX 毒素的释放,但对 P 限制无显著影响。

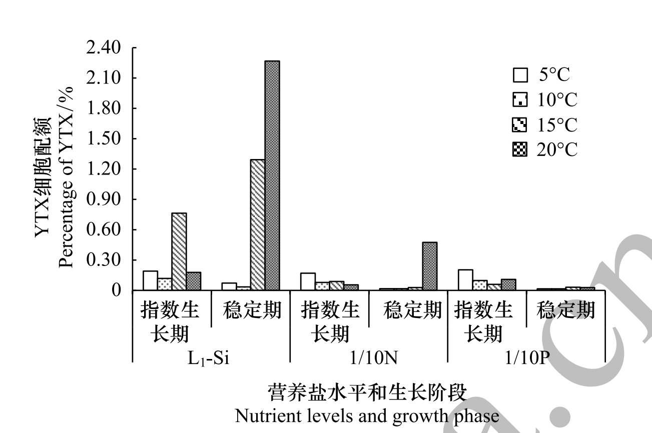


图 4　不同温度和营养盐条件下指数生长期和稳定期滤液中 YTX 毒素的细胞配比

Fig.4　Percentage of YTX in the media filtrates of *P. reticulatum* in the exponential and the stationary phase respectively at different temperature and nutrient levels

3　讨论

3.1　温度和 N、P 限制对网状原角藻生长的影响

温度是影响赤潮生物生长、繁殖、代谢等的重要环境因子,也是赤潮爆发的关键影响因子之一。每种赤潮生物都有自己生存的最适生长温度和温度范围。本研究中采用的网状原角藻是 2014 年 5 月首次分离自我国的北黄海海域,当时该藻以较高密度存在于 5 m 以浅的表层海水中,海水表层温度在 15℃左右。而本研究的实验结果表明,在 20℃的 L_1-Si 培养基中,藻细胞比生长速率和指数生长期结束时藻细胞密度最高,分别为 0.256 d^{-1}和 $1.1×10^7/L^{-1}$,比 15℃时略高(分别为0.252 d^{-1}和 $1.04×10^7/L^{-1}$);但在 20℃时,藻细胞在指数期结束后很快就进入衰退期,藻细胞密度降为原来的 70%;而 15℃条件下,藻细胞在经过较长的稳定期后细胞密度又开始增加。另外,在预实验中我们也发现,20℃培养时,藻细胞的生长周期比低温度条件下短,25℃培养条件下藻细胞密度很低,且藻细胞严重变形;而 30℃时在接种后的较短时间内藻细胞即死亡(预实验的结果,未显示),可见,该株藻适宜在较低温度下生长。Guerrini 等[18]和 Röder 等[13]分别以分离自意大利和德国近岸海域的网状原角藻进行研究也发现 20℃和 15℃分别是上述两株藻的最适生长温度。Koike 等[24]在对日本北部 Okkirai Bay 水体中网状原角藻种群的季节变化进行了 1 周年的调查后发现,温度在 8.23—19.99℃范围内,水体中能够检测到网状原角藻细胞,形成赤潮并且细胞密度达到峰值时水温在 14.3—16.53℃之间。在我国北黄海海域分离到的网状原角藻与上述研究中的藻株的适宜生长温度非常接近,推测其在北黄海海域大量增殖并引发赤潮最有可能是在春末夏初季节,这与现场调查结果也一致。Okolodkov 等[25]在通过分析 1976—1999 年期间欧亚北极地区的 28 次调查(539 个站位,1810 个样品)的数据和 500 多篇相关文献后得出:网状原角藻分布范围大致在 25—0℃等温线之间,主要分布在 15℃等温线附近海域。上述研究结果也解释了为什么在热带海域较少发生该藻赤潮[24, 26-27]。

水体中氮、磷的种类、组成和含量不仅对赤潮生物的生长、生理生化过程有着重要的影响,而且对赤潮形成的规模和程度也起着决定性的作用。

本研究结果表明,网状原角藻的生长更多地受 P 限制的影响而不是 N 限制,藻细胞大量增殖时对 P 的需求较大,当环境中 P 的浓度比较低时,P 可能成为网状原角藻生长的限制因子。这与 Guerrini 等[18]和 Röder 等[13]对网状原甲藻的研究结果相同,也与其他许多产腹泻性贝毒[28-29]和麻痹性贝毒[30-1]的甲藻中的研究结果相同。另外,Rodríguez 等[21]开展的网状原角藻对大量营养盐需求的研究结果也间接证实了上述结论。他们发现,L_1培养基中 P 的浓度远远不能满足网状原角藻生长的需要,当 P 的浓度增加到 217 μmol/L($6×L_1$)时藻细胞的生长速率和生物量达到最大,超过此浓度藻细胞的生长才会受到抑制;而 N 在 882 μmol/L($1×L_1$)—8824 μmol/L($10×L_1$)浓度范围内对藻细胞的生长均无明显影响,本研究中将 N 浓度降低至 88.2 μmol/L($1/10×L_1$)时,对藻细胞的生长影响也不显著,推测该藻对 N 浓度的改变不敏感。但是根据实验室的研究结果外推现场中藻的生长状况是很难的,即便是现场调查的结果,也很难得出确切的结论,如 Koike 等[24]在现场调

chinaXiv:201706.00850v1
http://www.ecologica.cn

ChinaXiv合作期刊

查中发现环境中的 N 和 P 浓度与网状原角藻的爆发性增殖之间的没有相关性,网状原角藻赤潮发生前后水体中 N 和 P 的浓度始终处于较低的浓度水平。

研究中还发现,稳定期后期,L_1-Si 培养基中藻细胞密度却出现明显的返增现象,这可能是取样后期培养瓶中培养液体积减少,空气增多,细胞周围气体不断更新和交换,加之 L_1-Si 培养基中 N、P 营养盐本身就过量,培养后期仍有剩余,几种因素共同促进了细胞的生长和繁殖。由于本研究并未对培养过程中营养盐的变化进行检测,所以 L_1-Si 培养基中藻细胞密度在衰败期返增现象的具体原因还需要进一步的研究。

3.2 温度和 N、P 限制对网状原角藻产毒的影响

温度对有毒甲藻产毒能力的影响存在明显的种间差异,即使是同一种甲藻,不同地理株系间产毒情况也不完全相同。本研究中,在无营养盐限制的 L_1-Si 培养基中,温度对网状原角藻的产毒能力影响不大。这与 Manuel[32] 研究分离自格陵兰岛附近海域的网状原角藻产 YTX 的能力随温度变化情况相一致;而 Röder 等[13] 的研究表明分离自德国北海湾的网状原角藻在低温下产 YTX 的能力更强;另外,Guerrini 等[18] 研究却发现,在较高温度(26℃)下,分离自意大利海域的网状原角藻能够产生更多的 YTX。但是,温度对藻细胞产毒的影响在有营养盐限制或不足时变得比较显著,这可能是营养盐限制使毒素合成过程中某些酶的活性对温度更加敏感,从而直接或间接影响毒素的合成。

有研究表明,在营养平衡的条件下,藻类产毒量往往较低;而当营养失衡,尤其是在低磷浓度的条件下,能够刺激藻类产毒增加,高浓度溶解无机磷,往往不利于毒素的蓄积[33],本研究结果也支持上述观点。在 15℃ P 限制培养基中稳定期的藻细胞中 YTX 含量最高,达到 92.6 pg/细胞,是同一温度相同生长阶段 L_1-Si 培养基中的 7 倍有余。由于 P 限制情况下,细胞密度显著降低而细胞体积变大,如果以单位体积培养液来衡量毒素含量的变化,那么磷限制对毒素合成的影响就明显削弱了,类似的结果在以往对亚历山大藻的研究中已被多次报道[34-37]。尽管如此,P 限制下单位体积培养液中 YTX 的含量仍是营养盐平衡条件下的 1.5—2 倍。

甲藻对营养物质吸收的能力比其它藻类差,在营养限制条件下,甲藻的竞争能力会比其他硅藻和无毒甲藻差[38],而毒素的产生可能是其对低营养利用率的一种补偿性竞争策略[39],可以作为对摄食浮游藻类生物的威慑,防止被摄食;当营养不平衡时,毒素作为营养储存化合物,也可以减轻某些过剩营养物质对藻造成的不利影响[34, 40]。YTX 为多环聚醚类化合物,其分子中不含 N、P 原子,营养盐对其合成的影响可能是通过直接或间接影响与 YTX 合成相关酶及相关中间产物来实现的。通过稳定性同位素投喂实验发现,YTX 分子中碳骨架结构起源于聚酮类化合物(polyketides)[41],而聚酮类化合物碳链的组装在一定程度上与脂肪酸的合成相关[42]。根据以上推测,当 N、P 限制时,YTX 毒素的合成可能与网状原角藻细胞的脂肪酸代谢有关,但这需要实验来验证。

关于滤液中 YTX 的含量,Guerrini 等[18] 与 Paz 等[11] 均认为滤液中检测到的 YTX 是由细胞死亡后释放到培养基中导致的。本研究的结果也基本与上述观点一致,高温及稳定期中后期后死亡细胞增多,滤液中的 YTX 浓度升高。但本研究中,无论在什么培养条件下,整个培养过程中,只有很少一部分 YTX 释放到滤液中,这与 Röder 等[13] 对分离自德国北海的网状原角藻在 N 限制下释放 43% 的 YTX 毒素到滤液中的研究结果不同,这可能由于不同株系、不同培养条件及检测方法等不同所导致。

4 结论

温度和营养盐限制对网状原角藻生长和产毒均有影响,其中营养盐的影响更为显著和强烈。

本研究中,网状原角藻在 15℃ L_1-Si 培养基中生长最好;N、P 限制均有利于 YTX 毒素的合成和累积,15℃ 时 P 限制培养基中胞内 YTX 含量最高。

参考文献(References):

[1] Satake M, Ichimura T, Sekiguchi K, Yoshimatsu S, Oshima Y. Confirmation of yessotoxin and 45, 46, 47-trinoryessotoxin production by

chinaXiv:201706.00850v1

ChinaXiv合作期刊

Protoceratium reticulatum collected in Japan. Natural Toxins, 1999, 7(4): 147-150.

[2] Miles C O, Wilkins A L, Hawkes A D, Selwood A, Jensen D J, Aasen J, Munday R, Samdal I A, Briggs L R, Beuzenberg V, MacKenzie A L. Isolation of a 1, 3-enone isomer of heptanor-41-oxoyessotoxin from *Protoceratium reticulatum* cultures. Toxicon, 2004, 44(3): 325-336.

[3] Miles C O, Wilkins A L, Hawkes A D, Selwood A, Jensen D J, Munday R, Cooney J M, Beuzenberg V. Polyhydroxylated amide analogs of yessotoxin from *Protoceratium reticulatum*. Toxicon, 2005, 45(1): 61-71.

[4] Miles C O, Wilkins A L, Selwood A I, Hawkes A D, Jensen D J, Munday R, Cooney J M, Beuzenberg V, MacKenzie A L. Isolation of Yessotoxin 32-O-[β-L-arabinofuranosyl-(5′→1″)-β-l-arabinofuranoside] from *Protoceratium reticulatum*. Toxicon, 2006, 47(5): 510-516.

[5] Eiki K, Satake M, Koike K, Ogata T, Mitsuy T, Oshima Y. Confirmation of yessotoxin production by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in Mutsu Bay. Fisheries Science, 2005, 71(3): 633-638.

[6] Suzuki T, Horie Y, Koike K, Satake M, Oshima Y, Iwataki M, Yoshimatsu S. Yessotoxin analogues in several strains of *Protoceratium reticulatum* in Japan determined by liquid chromatography-hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 2007, 1142(2): 172-177.

[7] Samdal I A, Naustvoll L J, Olseng C D, Briggs L R, Miles C O. Use of ELISA to identify *Protoceratium reticulatum* as a source of yessotoxin in Norway. Toxicon, 2004, 44(1): 75-82.

[8] Samdal I A, Olseng C D, Sandvik M, Miles C O, Briggs L R, Torgersen T, Jensen D J, Cooney J M. Profile of yessotoxin analogues in a Norwegian strain of *Protoceratium reticulatum*//5th International Conference on Molluscan Shellfish Safety. Galway, Ireland, 2006: 118-118.

[9] Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Magno S, Guerrini F, Pistocchi R, Boni L. Complex yessotoxins profile in *Protoceratium reticulatum* from north-western Adriatic sea revealed by LC-MS analysis. Toxicon, 2003b, 42(1): 7-14.

[10] Stobo L A, Lewis J, Quilliam M A, Hardstaff W R, Gallacher S, Webster L, Smith E A, Mckenzie M. Detection of yessotoxin in UK and Canadian isolates of phytoplankton and optimization and validation of LC-MS methods // Bates S, ed. Eighth Canadian workshop on Harmful Marine Algae. New Brunswick: Gulf Fisheries, 2003: 8-14.

[11] Paz B, Riobó P, Fernández M L, Fraga S, Franco J M. Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture. Toxicon, 2004, 44(3): 251-258.

[12] Paz B, Riobó P, Ramilo I, Franco J M. Yessotoxins profile in strains of *Protoceratium reticulatum* from Spain and USA. Toxicon, 2007, 50(1): 1-17.

[13] Röder K, Hantzsche F M, Gebühr C, Miene C, Helbig T, Krock B, Hoppenrath M, Luckas B, Gerdts G. Effects of salinity, temperature and nutrients on growth, cellular characteristics and yessotoxin production of *Protoceratium reticulatum*. Harmful Algae, 2012, 15: 59-70.

[14] Konishi M, Yang X M, Li B, Fairchild C R, Shimizu Y. Highly cytotoxic metabolites from the culture supernatant of the temperate dinoflagellate *Protoceratium cf. reticulatum*. Journal of Natural Products, 2004, 67(8): 1309-1313.

[15] Pérez-Gómez A, Ferrero-Gutierrez A, Novelli A, Franco J M, Paz B, Fernández-Sánchez M T. Potent neurotoxic action of the shellfish biotoxin yessotoxin on cultured cerebellar neurons. Toxicological Sciences, 2006, 90(1): 168-177.

[16] Ogino H, Kumagai M, Yasumoto T. Toxicologic evaluation of yessotoxin. Natural Toxins, 1997, 5(6): 255-259.

[17] Seamer C. The production of yessotoxin by *Protoceratium reticulatum*[D]. Wellington, New Zealand: Victoria University of Wellington, 2001.

[18] Mitrovic S M, Amandi M F, McKenzie L, Furey A, James K J. Effects of selenium, iron and cobalt addition to growth and yessotoxin production of the toxic marine dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in culture. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004, 313(2): 337-351.

[19] Paz B, Vázquez J A, Riobó P, Franco J M. Study of the effect of temperature, irradiance and salinity on growth and yessotoxin production by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in culture by using a kinetic and factorial approach. Marine Environmental Research, 2006, 62(4): 286-300.

[20] Rodríguez J J G, Mirón A S, García M C C, Belarbi E H, Camacho F G, Chisti Y, Grima E M. Macronutrients requirements of the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*. Harmful Algae, 2009, 8(2): 239-246.

[21] Guerrini F, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Tartaglione L, Fattorusso E, Boni L, Pistocchi R. Influence of temperature, salinity and nutrient limitation on yessotoxin production and release by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in batch-cultures. Harmful Algae, 2007, 6(5): 707-717.

[22] 陈建华, 于仁成, 孔凡洲, 高岩, 罗璇, 王云峰, 周名江. 北黄海海域虾夷扇贝体内脂溶性藻毒素分析. 海洋与湖沼, 2014, 45(4): 855-863.

[23] Guillard R R L, Hargraves P E. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. Phycologia, 1993, 32(3): 234-236.

[24] Koike K, Horie Y, Suzuki T, Kobiyama A, Kurihara K, Takagi K, Kaga S N, Oshima Y. *Protoceratium reticulatum* in northern Japan: environmental factors associated with seasonal occurrence and related contamination of yessotoxin in scallops. Journal of Plankton Research, 2006, 28(1): 103-112.

chinaXiv:201706.00850v1
http://www.ecologica.cn

ChinaXiv合作期刊

[25] Okolodkov Y B. The global distributional patterns of toxic, bloom dinoflagellates recorded from the Eurasian Arctic. Harmful Algae, 2005, 4(2): 351-369.

[26] Boni L, Ceredi A, Guerrini F, Milandri A, Pistocchi R, Poletti R, Pompei M. Toxic *Protoceratium reticulatum* (*Peridiniales*, *Dinophyta*) in the North-Western Adriatic Sea (Italy) // Hallegraeff G M, Blackburn S I, Bolch C J, Lewis R J, eds. Harmful algae. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 2001: 137-140.

[27] Aasen J, Samdal I A, Miles C O, Dahl E, Briggs L R, Aune T. Yessotoxins in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*): uptake from *Protoceratium reticulatum*, metabolism and depuration. Toxicon, 2005, 45(3): 265-272.

[28] Varkitzi I, Pagou K, Granéli E, Hatzianestis I, Pyrgaki C, Pavlidou A, Montesanto B, Economou-Amilli A. Unbalanced N: P ratios and nutrient stress controlling growth and toxin production of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. Harmful Algae, 2010, 9(3): 304-311.

[29] Vanucci S, Pezzolesi L, Pistocchi R, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Iacovo E D, Fattorusso E, Tartaglione L, Guerrini F. Nitrogen and phosphorus limitation effects on cell growth, biovolume, and toxin production in *Ostreopsis* cf. *ovata*. Harmful Algae, 2012, 15: 78-90.

[30] Granéli E, Flynn K. Chemical and physical factors influencing toxin content // Granéli E, Turner J T, eds. Ecological Studies: Ecology of Harmful Algae. Berlin: Springer-Verlag, Heidelberg, 2006, 189: 229-241.

[31] Lim P T, Leaw C P, Kobiyama A, Ogata T. Growth and toxin production of tropical *Alexandrium minutum* Halim (Dinophyceae) under various nitrogen to phosphorus ratios. Journal *of Applied Phycology*, 2010, 22(2): 203-210.

[32] Manuel S. Effect of temperature on growth and production of YTXs and lytic compounds by *Protoceratium reticulatum* from Greenland[D]. Bremen: University of Bremen, 2014.

[33] Markou G. Alteration of the biomass composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* under various amounts of limited phosphorus. Bioresource Technology, 2012, 116: 533-535.

[34] Boyer G L, Sullivan J J, Anderson R J, Harrison P J, Taylor F J R. Effects of nutrient limitation on toxin production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. Marine Biology, 1987, 96(1): 123-128.

[35] Anderson D M, Kulis D M, Sullivan J J, Hall S, Lee C. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp. Marine Biology, 1990, 104(3): 511-524.

[36] Flynn K, Franco J M, Ferandez P, Reguera B, Zapata M, Wood G, Flynn K J. Changes in toxin content, biomass and pigments of the dinoflagellate *Alexabdrium minutum* during nitrogen refeeding and growth into nitrogen or phosphorus stress. Marine Ecology Progress Series, 1994, 111: 99-109.

[37] John E H, Flynn K J. Modelling changes in paralytic shellfish toxin content of dinoflagellates in response to nitrogen and phosphorus supply. Marine Ecology Progress Series, 2002, 225: 147-160.

[38] Smayda T J. Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. Limnology and Oceanography, 1997, 42(5): 1137-1353.

[39] Frangópulos M, Guisande C, deBlas E, Maneiro I. Toxin production and competitive abilities under phosphorus limitation of *Alexandrium* species. Harmful Algae, 2004, 3(2): 131-139.

[40] Cembella A D. Ecophysioology and metabolism of paralytic shellfish toxins in marine microalgae // Anderson D M, Cembella A D, Hallegraeff G M, eds. Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms, Berlin: Springer-Verlag, 1998: 381-403.

[41] Rein K S, Snyder R V. The biosynthesis of polyketide metabolites by dinoflagellates. Advances in Applied Microbiology, 2006, 59: 93-125.

[42] Rein K S, Borrone J. Polyketides from dinoflagellates: origins, pharmacology and biosynthesis. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 124(2): 117-131.

chinaXiv:201706.00850v1

http://www.ecologica.cn